

UJI TEKNIK RT-PCR UNTUK PEMERIKSAAN VIRUS *DENGUE-3* PADA NYAMUK *Aedes aegypti* YANG DIINFEKSI SECARA INTRATHORAKAL

RT-PCR TEST FOR DETECTION OF DENGUE VIRUS-3 IN INTRATHORACALLY INFECTED Aedes aegypti

Asyhar Tunissea*, Dyah Widiastuti* dan Nastiti Wijayanti**

* Loka Litbang P2B2 Banjarnegara
Jln. Selamanik No. 16 A Banjarnegara 53415

** Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada
Pos-el: loka_banjarnegara@yahoo.com

ABSTRACT

Dengue viruses, globally the most prevalent arboviruses, are transmitted to humans by persistently infected Aedes aegypti. Detection of Dengue viral RNA in mosquito thorax using Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assay is an alternatives method for Dengue vector surveillance. The study aimed to test RT-PCR technique to detection Dengue-3 in intrathoracally infected Ae. aegypti. The study design was experimental with descriptive analytic using mosquitoes of Dengue Virus-3 were used as infectious samples and non-infected adult Ae. aegypti mosquitoes were used as normal ones. The results shows the RT-PCR technique can detect Dengue-3 viral RNA in intrathoracally Ae. aegypti at 5th, 6th and 7th days incubation.

Keywords: Mosquitoes, *Aedes aegypti*, Dengue viruses, Polymerase chain reaction

ABSTRAK

Virus Dengue merupakan salah satu arbovirus paling banyak tersebar di seluruh dunia yang ditularkan ke manusia oleh nyamuk *Aedes aegypti*. Deteksi RNA virus Dengue pada *thorax* nyamuk *Ae. aegypti* menggunakan Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) merupakan salah satu metode alternatif yang dapat digunakan untuk surveilans vektor Dengue. Penelitian ini bertujuan menguji teknik RT-PCR untuk pemeriksaan virus Dengue-3 pada sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang telah diinfeksi secara intrathorakal. Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan analisis secara deskriptif menggunakan nyamuk *Ae. aegypti* yang telah diinfeksi virus Dengue-3 secara intrathorakal sebagai kelompok infeksius, sedangkan kelompok normal menggunakan *Ae. aegypti* yang tidak diinfeksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik RT-PCR dapat mendeteksi RNA virus Dengue-3 pada nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi secara intrathorakal mulai masa inkubasi hari ke-5, 6, dan 7.

Kata Kunci : Nyamuk, *Aedes aegypti*, Virus dengue-3, Polymerase chain reaction

PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu penyakit infeksi yang masih menjadi permasalahan kesehatan di Indonesia. Kasus DBD dilaporkan pertama kali di Indonesia pada tahun 1968 di Surabaya dan Jakarta sebanyak 58 kasus

dengan *Case Fatality Rate* (CFR) 41%.¹ Demam Berdarah Dengue disebabkan oleh virus *Dengue* yang terdiri atas empat serotipe, yaitu *Dengue-1*, *Dengue-2*, *Dengue-3*, dan *Dengue-4*. Dari keempat serotipe tersebut *Dengue-3* diketahui merupakan serotipe yang paling dominan di

Indonesia. Vektor penular penyakit DBD adalah nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*, namun yang paling berperan dalam penularan adalah nyamuk *Ae. aegypti* karena perilaku hidupnya di dalam dan sekitar rumah sehingga lebih memungkinkan kontak dengan manusia.²

Untuk mengetahui keberadaan virus *Dengue* dalam tubuh nyamuk *Ae. aegypti* secara *artificial* dibutuhkan prosedur standar. Injeksi intrathorakal adalah suatu prosedur standar untuk memasukkan suatu substansi, baik berupa senyawa kimia maupun mikroorganisme dalam dosis tertentu ke dalam tubuh serangga uji. Metode ini telah dibakukan oleh *Rosen and Gubler* untuk menginfeksi virus *Dengue* ke dalam nyamuk *Ae. aegypti*.³

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) telah dikembangkan pada sejumlah RNA virus dan berpotensi menjadi metode alternatif untuk diagnosa laboratoris *Dengue*. Metode ini diketahui cepat dan sensitif untuk mendeteksi RNA virus pada sampel *suspect dengue*, jaringan autopsi, dan nyamuk.⁴ Beberapa protokol pemeriksaan PCR untuk infeksi *Dengue* telah berhasil distandarisasi, di antaranya adalah protokol Yong, *et al.*⁵

Yong, *et al.*⁵ mengembangkan metode *multiplex* RT-PCR. *Forward conserved* primer didesain terhadap *regio* '5-UTR (*untranslated region*), dan empat *reverse primer* didesain untuk mendeteksi area pada protein M dan C yang spesifik terhadap serotipe DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4. Penampilan diagnosis metode tersebut sangat baik karena mempunyai sensitivitas 98% dan spesifisitas 100% untuk sampel darah manusia. Namun, protokol tersebut belum pernah diujikan untuk sampel dari organ nyamuk vektor. Penelitian ini bertujuan menguji teknik RT-PCR menggunakan protokol Yong, *et al.*⁵ untuk pemeriksaan virus *Dengue-3* pada sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang telah diinfeksi secara intrathorakal.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan secara eksperimental pada bulan Mei 2009 sampai dengan November 2010. Penentuan jumlah sampel dilakukan dengan mengikuti formula Puspongoro, dkk.⁶

Dalam penelitian ini digunakan sampel 70 ekor nyamuk *Ae. aegypti*, 35 ekor nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi buatan dengan virus *Dengue-3* secara intrathorakal sebagai sampel infeksius dan 35 ekor nyamuk *Ae. aegypti* koloni laboratorium yang tidak diinfeksi virus *Dengue-3* sebagai sampel normal.

Optimasi

Dilakukan dua kali optimasi sebelum penelitian dilakukan. Optimasi yang pertama untuk memilih metode infeksi virus *Dengue-3* ke dalam nyamuk *Ae. aegypti*. Hasil optimasi menunjukkan metode injeksi intrathorakal lebih efektif untuk menginfeksi virus *Dengue-3* ke nyamuk *Ae. aegypti* dibandingkan dengan metode *membrane feeding*. Hal ini dibuktikan dari hasil PCR yang diperoleh. Nyamuk yang diinfeksi secara intrathorakal (inkubasi lima hari) dapat dideteksi keberadaan virus *Dengue-3* menggunakan PCR secara individual. Adapun nyamuk yang diinfeksi secara *membrane feeding* (inkubasi 10 hari) belum dapat terdeteksi keberadaan virus *Dengue-3* menggunakan PCR secara individual (data tidak ditampilkan).

Optimasi kedua dilakukan untuk menentukan kit yang akan digunakan pada proses isolasi RNA virus *Dengue-3* dari nyamuk *Ae. aegypti*. Pada kegiatan optimasi tersebut digunakan berbagai jenis kit isolasi RNA antara lain *Trizol* Invitrogen, *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, USA), dan *High Pure Viral Isolation Kit* (Roche, Germany). Dari ketiga kit tersebut, yang berhasil digunakan untuk mengisolasi RNA virus *Dengue-3* dari organ *thorax* nyamuk *Ae. aegypti* secara individual adalah *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, USA) dan *High Pure Viral Isolation Kit* (Roche, Germany). Adapun *Trizol* Invitrogen belum berhasil mengisolasi RNA virus *Dengue-3* dari organ *thorax* nyamuk *Ae. aegypti* secara individual (data tidak ditampilkan). Selanjutnya, pada penelitian ini digunakan *High Pure Viral Isolation Kit* (Roche, Germany).

Pembuatan sediaan nyamuk *Ae. aegypti* infeksius

Pembuatan sediaan nyamuk *Ae. aegypti* yang terinfeksi virus *Dengue-3* ini dilakukan oleh tenaga teknis di Laboratorium Parasitologi

Fakultas Kedokteran UGM. Nyamuk yang telah dipingsankan diambil dari dalam tabung kaca lalu disuntik dengan supernatan kultur virus *Dengue-3* menggunakan perangkat *intrathorax injection*. Selanjutnya, nyamuk yang telah disuntik dimasukkan dalam *paper cup* dan dipelihara sampai masa inkubasi yang diinginkan. Nyamuk infeksius dipanen pada masa inkubasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 hari masing-masing sebanyak lima ekor.

Bagian *thorax* dari nyamuk uji diisolasi RNA virus *Dengue*, kemudian diamplifikasi (digandakan) dengan teknik RT-PCR. Uji ini menggunakan supernatan sel C6/36 yang diinfeksi virus *Dengue-3* sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatif adalah sediaan sel C6/36 yang tidak diinfeksi virus *Dengue*. Hasil uji RT-PCR pada organ *thorax* disebut positif mengandung virus *Dengue* jika terdapat band 538 bp (*base pair*)⁵,

sedangkan disebut negatif jika tidak terdapat band 538 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan RT-PCR dengan metode injeksi intrathorakal disajikan dalam Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan secara kualitatif bahwa pemeriksaan *Conventional One Step* RT-PCR dapat mendeteksi virus *Dengue-3* pada nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi secara intrathorakal mulai masa inkubasi hari ke-5. Hal ini terlihat dari produk RT-PCR yang terletak pada posisi yang sesuai dengan target yang dikehendaki pada amplifikasi menggunakan primer Dcon dan D3 (538 bp). Inkubasi hari ke-1, 2, 3, 4 pada nyamuk yang diinfeksi virus *Dengue-3* serta nyamuk yang tidak diinfeksi virus *Dengue-3* tidak



Gambar 1. Foto hasil elektroforesis produk RT-PCR dari sampel nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi virus *Dengue-3* pada gel agarose 1,5%. M: marker 100 bp ladder, P: kontrol positif dari sel C6/36 yang diinfeksi virus *Dengue-3*, Lane 1–7: inkubasi masing-masing nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi dari hari ke-1 sampai hari ke-7, Lane 8: nyamuk yang tidak diinfeksi

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Virus *Dengue-3* Menggunakan RT-PCR pada Nyamuk *Ae. aegypti*

Inkubasi (hari)	Jumlah sampel	Hasil RT-PCR		Infection rate (%)
		Positif	Negatif	
0 (hari) tidak diinfeksi	35	0	35	0
1 hari	5	0	5	0
2 hari	5	0	5	0
3 hari	5	0	5	0
4 hari	5	0	5	0
5 hari	5	1	4	20
6 hari	5	4	1	80
7 hari	5	5	0	100

terlihat adanya produk RT-PCR pada posisi 538 bp.⁵

Hasil pemeriksaan RT-PCR pada nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi virus *Dengue-3* secara lengkap ditunjukkan pada Tabel 1, di mana terlihat bahwa *infection rate* yang terbesar tercatat pada masa inkubasi tujuh hari (100%). Untuk nyamuk yang diinfeksi dengan masa inkubasi 1–4 hari serta nyamuk yang tidak diinfeksi tidak terdeteksi oleh RT-PCR. Pada pemeriksaan RT-PCR untuk deteksi virus *Dengue-3* pada nyamuk yang diinfeksi secara intrathorakal, terdapat variasi dalam volume RNA virus yang digunakan dan juga siklus amplifikasinya.

Tabel 1 menunjukkan bahwa *infection rate* yang paling tinggi dari hasil pemeriksaan RT-PCR dicapai pada masa inkubasi tujuh hari. Hal ini disebabkan karena pada hari ke-7 pasca-inokulasi virus telah bereplikasi dalam tubuh nyamuk sehingga titernya menjadi lebih tinggi.

Variasi volume RNA dan siklus amplifikasi pada pemeriksaan RT-PCR untuk deteksi virus *Dengue-3* pada nyamuk *Ae. aegypti* disajikan dalam Tabel 2.

Pada sebagian sampel meskipun telah diinkubasi selama tujuh hari tetap membutuhkan volume RNA yang lebih besar ataupun jumlah siklus amplifikasi (penggandaan) yang lebih banyak. Untuk sampel dengan masa inkubasi 1–4 hari telah dicoba untuk dilakukan presipitasi RNA dan kemudian diuji PCR dengan volume RNA 10 µL dan siklus amplifikasi sebanyak 35 siklus. Namun, hasil uji PCR pada sampel tersebut tetap negatif.

Pada masa inkubasi lima hari, virus *Dengue-3* dapat dideteksi dari satu sampel nyamuk infeksius

dengan volume RNA 10 µL. Dengan inkubasi enam hari, virus *Dengue-3* dapat dideteksi dari satu sampel nyamuk infeksius dengan volume RNA 5 µL, satu sampel nyamuk infeksius dengan volume RNA 8 µL dan dua sampel nyamuk infeksius dengan volume RNA 10 µL. Adapun pada masa inkubasi tujuh hari virus *Dengue-3* dapat dideteksi dari tiga sampel infeksius dengan volume RNA 8 µL dan dua sampel nyamuk infeksius dengan volume RNA 10 µL. Tidak terdeteksinya virus *Dengue-3* pada masa inkubasi tujuh hari dengan volume RNA 5 µL dapat terjadi karena adanya penurunan kualitas kultur virus sehingga tidak dapat dideteksi oleh RT-PCR.

Beberapa protokol RT-PCR untuk deteksi virus *Dengue* telah disusun, salah satu yang paling awal dan digunakan secara luas adalah protokol *Lanciotti*.⁴ Pada protokol tersebut, digunakan *primer* D1 dan D2 yang merupakan *primer universal* untuk virus *Dengue* karena dapat mengenali keempat serotipe virus *Dengue*. Sepasang *primer* ini akan melekat pada sekuen gen yang menyandi protein M dan C, dan akan menghasilkan produk PCR sepanjang 511 bp (*base pair*) untuk keempat serotipe virus *Dengue*.

Adapun *Type-Specific primer* yang digunakan adalah TS1, TS2, TS3, dan TS4. TS1, TS2, TS3, dan TS4 merupakan susunan *reverse primer* yang dapat mengenali *serotype* virus *dengue* (DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4) secara spesifik. Untuk mendeteksi masing-masing *serotype* virus *Dengue*, digunakan *forward primer* D1 dan *reverse primer* TS1, TS2, TS3, dan TS4. Susunan primer inilah yang banyak digunakan pada berbagai penelitian mengenai virus *Dengue* terutama di negara-negara Asia Tenggara.⁷ Namun, telah dilaporkan juga bahwa penggunaan

Tabel 2. Variasi Volume RNA dan Siklus Amplifikasi dalam Uji RT-PCR

Masa inkubasi (hari)	Jumlah nyamuk yang positif		
	Vol RNA 5µL	Vol RNA 8µL	Vol RNA 10µL
0 hari (tidak diinfeksi)	0	0	0
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	1
6	1	1	2
7	0	3	2

primer ini terbukti kurang efektif untuk mendeteksi virus *Dengue*. Reynes, *et al.*⁷ melaporkan bahwa *primer* D1 dan TS1 gagal mendeteksi beberapa sampel darah yang terinfeksi *Dengue-1*. Kegagalan ini disebabkan karena adanya mutasi titik pada beberapa varian *Dengue-1*. Protokol yang disusun Yong, *et al.*⁵ memperbaiki protokol Lanciotti, *et al.*⁴

Deteksi RNA virus *Dengue-3* dari organ thorak nyamuk *Ae. aegypti* pada penelitian ini dilakukan menggunakan *One step* RT-PCR. Thorak merupakan salah satu organ nyamuk yang sel-selnya diketahui memiliki reseptor terhadap virus *Dengue*.⁸ Jittmittraphap *et al.*⁹ menyatakan bahwa dari hasil penelitiannya pada nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi secara intrathorakal dengan virus *Dengue-2* terbukti bahwa RNA virus dapat diisolasi paling banyak di organ *thorax* dengan menggunakan *Nucleic Acid-Sequenced Based Amplification* (NASBA).

RT-PCR merupakan salah satu tipe PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi (mengandakan) sekuen asam nukleat yang berupa RNA. Kestabilan rantai RNA jauh lebih rendah dibanding rantai DNA.¹⁰ Terlebih lagi dalam hal ini *genom* dari virus *Dengue* yang menjadi target deteksi pada penelitian ini adalah RNA *single strand* yang sangat mudah terdegradasi oleh *nuklease*. Oleh karena itu, proses deteksi RNA pun membutuhkan kecermatan yang lebih dibanding deteksi DNA.

Secara umum, RT-PCR meliputi tiga tahap, yaitu tahap *reverse transcription*, tahap denaturasi dsDNA pada suhu 95°C, dan tahap sintesis DNA dari *primer* yang dilakukan menggunakan enzim Taq DNA *polymerase* yang *thermostable* dan keberadaan dNTP. Pada tahap *reverse transcription* (RT), RNA ditranskrip menjadi cDNA menggunakan enzim *reverse transcriptase* dan *primer*. Tahap ini sangat penting untuk keberhasilan proses PCR karena enzim *DNA polymerase* yang digunakan untuk menghasilkan *amplicon* hanya dapat bekerja pada *template* yang berupa DNA. Tahap *reverse transcription* (RT) ini dapat dilakukan baik pada tabung yang sama dengan PCR (*one-step* PCR) maupun pada tabung yang berbeda dengan PCR (*two-step* PCR).¹⁰

Pada penelitian ini digunakan metode *one-step* RT PCR yang diketahui memiliki beberapa

kelebihan dibanding dengan *two-step* RT-PCR di antaranya waktu pemeriksaan lebih singkat, biaya lebih hemat serta meminimalisasi terjadinya kontaminasi. Hal ini sangat menguntungkan karena dapat memberikan informasi secara lebih cepat pada petugas medis untuk memulai terapi yang tepat. Di samping itu, keseluruhan kelebihan ini membuat metode *one-step* menjadi metode diagnostik yang lebih cepat, murah, dan efektif untuk digunakan di negara-negara berkembang yang merupakan daerah endemis infeksi *Dengue*.¹¹

Pada penelitian ini RNA virus *Dengue-3* pada nyamuk infeksius dengan masa inkubasi 1–4 hari belum dapat terdeteksi menggunakan RT-PCR. Yasmon, *et al.*¹² menyatakan bahwa *false negative* pada pemeriksaan RT-PCR dapat disebabkan karena jumlah partikel virus yang terlalu rendah di dalam sampel. Hasil positif antigen *Dengue-3* dengan deteksi RT-PCR mulai dapat terlihat pada inkubasi lima hari. Hal ini menunjukkan bahwa teknik RT-PCR dapat mendeteksi infeksi virus *Dengue-3* pada nyamuk *Ae. aegypti* secara lebih awal sebelum siklus hidup virus dalam tubuh nyamuk berlangsung secara sempurna. Foote, *et al.*¹³ menyatakan bahwa virus *Dengue* memerlukan masa inkubasi paling sedikit delapan hari di dalam tubuh nyamuk sebelum dapat ditularkan dalam bentuk yang *virulent* kepada inang manusia.

KESIMPULAN

Metode *one-step* RT PCR yang digunakan dalam penelitian ini memiliki beberapa kelebihan dibanding dengan *two-step* RT-PCR. Kelebihannya, yaitu waktu pemeriksaan lebih singkat, biaya lebih hemat dan meminimalisasi terjadinya kontaminasi sehingga membuat metode *one-step* menjadi metode diagnostik yang lebih cepat, murah, dan efektif untuk digunakan di negara-negara berkembang yang endemik DBD.

Teknik RT-PCR menggunakan protokol Yong, *et al.*⁵ dapat mendeteksi virus *Dengue-3* pada nyamuk *Ae. aegypti* yang diinfeksi secara intrathorakal mulai masa inkubasi hari ke-5, 6, dan 7 pada volume RNA dengan variasi 5 µL, 8 µL, dan 10 µL. Tidak terdeteksinya virus *Dengue-3* pada masa inkubasi tujuh hari dengan

volume RNA 5 µL dapat terjadi karena adanya penurunan kualitas kultur virus sehingga tidak dapat dideteksi oleh RT-PCR

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Rochadi Abdulhadi atas bimbingan dan sarannya dalam penulisan karya tulis ilmiah ini serta tenaga teknis di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Kristina, Isminah, Leni, W. 2004. *Kajian Kesehatan Demam Berdarah Dengue. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- ²Sungkar, S. 2005. Bionomik *Aedes aegypti*, vektor Demam Berdarah Dengue. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 4 (55): 384–389.
- ³Rosen, L, and D.J. Gubler. 1974. The use of Mosquitoes to Detect and Propagate Dengue viruses. *Am. J. trop. Med. Hyg*, 21: 1153–1160.
- ⁴Lanciotti, R.S. *et al.* 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, *Journal Clinical Microbiology*, 30 (3): 545–551.
- ⁵Yong, Y.K., R. Thayan, H.T. Chong, S.D. Sekaran. 2007. Rapid Detection and Serotyping of Dengue Virus by Multiplex RT-PCR and Real-Time SYBR green RT-PCR. *Singapore Medicine Journal*, (48): 662–68.
- ⁶Puspongoro, H.D. dkk. 2008. Uji diagnostik. Dalam: S. Sastroasmoro dan S. Ismael (Ed.). *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*, Edisi 3, hlm. 193–215. Jakarta: Sagung Seto.
- ⁷Reynes, J.M. *et al.* 2003. Improved Molecular Detection of Dengue Virus Serotype-1 variants. *Journal Clinical Microbiology*, (41) 8: 3864–3867.
- ⁸Mendoza, M. Y. *et al.* 2002. A Putative Receptor for Dengue Virus in Mosquito Tissue: Localization of a 45-KDA Glycoprotein. *Am.J.Trop.Med. Hyg*, 67 (1): 76–84.
- ⁹Jittmittraphap, A. *et al.* 2006. Rapid Detection of Dengue viral RNA in Mosquitoes by Nucleic Acid-Sequence Based Amplification (NASBA). *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, (37): 1117–1124.
- ¹⁰Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*, Edisi 1. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- ¹¹Saxena, P. *et al.* 2008. Development and Evaluation of One Step Single Tube Multiplex RT-PCR for Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses. *Virology*, 5: 20
- ¹²Yasmon, A., N.N.D. Fatmawati, F. Ibrahim, B. Bela. 2010. A second generation of RT-PCR assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *Med J Indonesia*, (19): 154–7.
- ¹³Foote, R.H., and D.R. Cooke. 1959. Mosquito-Transmitted Disease. *Mosquitoes of Medical Importance. Agricultural Research Service*. Washington D.C: U.S. Government Printing Office.